

## PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/51791</p> <p>(43) 国際公開日 1998年11月19日(19.11.98)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01665</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月10日(10.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平9/125899</td> <td>1997年5月15日(15.05.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/31840</td> <td>1998年2月13日(13.02.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者</p> <p>塩澤俊一 (SHIOZAWA, Shunichi) [JP/JP]</p> <p>〒651-2274 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人</p> <p>弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio)</p> <p>〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)</p>		特願平9/125899	1997年5月15日(15.05.97)	JP	特願平10/31840	1998年2月13日(13.02.98)	JP	<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平9/125899	1997年5月15日(15.05.97)	JP						
特願平10/31840	1998年2月13日(13.02.98)	JP						
<p>(54) Title: GENE CAUSATIVE OF RHEUMATOID ARTHRITIS, METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS, AND METHOD FOR THE DETERMINATION OF FACTORS CAUSING RHEUMATOID ARTHRITIS</p> <p>(54) 発明の名称 慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for the diagnosis of rheumatoid arthritis characterized by amplifying the PCR genomic DNA of a subject with the use of a gene causative of rheumatoid arthritis and located no more than <math>\pm 1</math> centimorgan apart from a DNA sequence hybridizable with microsatellite markers D1S214, D1S253, D8S556, DXS1001, DXS1047, DXS1205, DXS1227 and/or DXS1232 and at least one of the above microsatellite markers as primers, and comparing the resultant PCR products with the corresponding PCR products of a normal subject.</p> <div data-bbox="1130 1320 1511 1932"> <p>The figure consists of three vertically stacked graphs, each plotting the Maximal Lod Score (MLS) on the y-axis against the Genoto distance in cent Morgan on the x-axis. The top graph shows a sharp peak for D1S253 and D1S214 at approximately 0 cent Morgan. The middle graph shows a peak for DXS556 at approximately 5 cent Morgan. The bottom graph shows a peak for DXS1001 and DXS1047 at approximately 0 cent Morgan.</p> </div>								

# (57)要約

この出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、上記マイクロサテライトマーカーの少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TG	トーゴ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

## 明細書

### 慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法 および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法

#### 技術分野

この出願の発明は、慢性関節リウマチの疾患遺伝子、並びにこれらの遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法に関するものである。

#### 背景技術

慢性関節リウマチの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、この慢性関節リウマチの属する自己免疫疾患の多くは多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・増悪するため、疾患の正しい解明と適切な治療を行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。

慢性関節リウマチは、世界的には罹患率1%以下の疾患であるが(N.Engl.J. Med. 322:1277-1289, 1990)、患者の同胞では約8%以上が発症する(Cell, 85:311-318, 1996)ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。しかしながら、疾患の遺伝的因子を特定するため通常用いられている分子遺伝学的手法や遺伝子工学的手法は、自己免疫疾患に対しては有効に機能していない。何故ならば、自己免疫疾患は、癌のように突然変異を生じた1個の遺伝子の異常増殖という生物学的に単純な機構によって発症するものではないからである。また、疾患の遺伝的基盤を求める従来の古典的遺伝学的手法は、自己免疫疾患が多因子遺伝によることを明確にしたものの、その内部あるいは本体に立ち入ることはできなかった。

このように、慢性関節リウマチに関連する遺伝子については、その実体はもとより、染色体上の遺伝子座位すら全く捉えられていないのが実状であった。

一方、多型性マーカーを用いた連鎖解析法およびポジショナルクローニング法は、近年、遺伝性疾患の研究に革命的進歩をもたらした。これらの方法を用いることによって、従来は手がかりさえなかった疾患遺伝子の染色体局在が明らかにされただけではなく、多数の疾患について原因遺伝子が単離、解析されている(実験医学、vol. 12 No. 6: 80-85, 1994)。また最近では、多型性マーカーとしてマイクロサテライトマーカー(Nature, 359:794-801, 1992; Nature Genet., 7:246-339)を用いた連鎖解析と、古典的遺伝学の手法である患者家系の解析を組み合わせた同胞対解析法によって、I型糖尿病の原因遺伝子が単離され(Nature, 171: 130-136, 1994)、自己免疫疾患をはじめとする難病についても原因遺伝子の特定が可能であることが示唆されている。

この出願は、以上のとおりの事情と最新の研究動向を踏まえてなされたものであり、ヒト染色体上にその存在位置を新たに特定した慢性関節リウマチの疾患遺伝子、並びにこれらの遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法を提供することを目的としている。

#### 発明の開示

この出願は、上記の課題を解決する発明として、以下の各遺伝子を提供する。

(1) ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および/またはD1S253がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの

疾患遺伝子。

(3) ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

また、この出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

さらにこの出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの原因因子の決定方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第1～第5染色体地図である。

第2図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第6～第15染色体地図である。

第3図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第16～第22染色体地図および性染色体地図である。

第4図は、PCR産物のゲル電気泳動の一例である。

第5図は、PCR産物のジェノタイパーによる解析の一例である。

第6図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体

1～6にプロットした結果である。

第7図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体7～12にプロットした結果である。

第8図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体13～18にプロットした結果である。

第9図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体19～Xにプロットした結果である。

第10図は、この発明の疾患遺伝子を指示するマーカー部位を含めた複数のマーカー部位について、第1染色体(上段)、第8染色体(中段)およびX染色体(下段)ごとに、各マイクロサテライトマーカーのMLS値とターゲット遺伝子との遺伝的距離(単位:センチモルガン)の関係を示したグラフ図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、この発明の遺伝子について、その特定方法を詳しく説明する。

この発明の遺伝子は、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を慢性リウマチ患者およびその血縁者に対して実施することにより染色体座位を特定した複数の遺伝子である。すなわち、この発明者は、ヒト染色体の全長にわたってマイクロサテライトマーカー遺伝子のDNA上の多型性(CAの繰り返し配列による長さの多型)を利用して、慢性関節リウマチの疾患感受性に関係する全遺伝子座位を決定した。具体的な方法は以下のとおりである。

##### (1) ゲノムDNAの抽出

米国リウマチ学会の診断基準に合致し、関節破壊の程度がステージ2以上である慢性関節リウマチ患者(A)、別のリウマチ患者(B)とその健常同胞(C)を一組とし、合計35組を対象として解析した。各人から、EDTAを用いて抹消血(10ml)を採血し、これを20mlのバッファーI[0.32M sucrose, 5%v/v Triton X-100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 12mM Tris HCl(pH 7.6)]とゆるやかに混合し

て細胞膜を溶解した。遠心分離したのち、沈殿した核をバッファーⅡ[4M guanidine thiocyanate, 12mM EDTA, 375mM NaCl, 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.1M  $\beta$ -mercaptoethanol, 12mM Tris HCl(pH 7.6)]と反応させて核膜を溶解し、次いでエタノール沈殿によりDNAを抽出した。

## (2) マイクロサテライトDNAのPCR増幅とサイジング

抽出したゲノムDNAを鋳型として、第1図から第3図に示した染色体座位に対応するマイクロサテライトマーカー遺伝子を蛍光標識プライマー(パーキンエルマー社製)を用いてPCR増幅した。なお、マーカーD1S502はDNA増幅が技術的に困難なため使用しなかった。また、HLA-D領域を詳しく分析するため、D6D276の代わりにD6S299、D6S265、D6S273の各遺伝子を増幅した。また、以上のマイクロサテライトDNAの増幅に加え、HLA-D RB1領域近傍の遺伝子についても制限酵素断片長多型(RFLP)マーカーを用いてPCR増幅し、合計359マーカー部位に対して検索を行った。

なお、マイクロサテライトDNAの増幅におけるPCR反応溶液(15  $\mu$  l)の組成はDNA(30ng); プライマー混合物(0.2  $\mu$  M); dNTP(各 0.2mM); DNAポリメラーゼ(1 unit); MgCl<sub>2</sub>(2.5mM); 1x PCRバッファーⅡであり、増幅反応の条件は、94℃で10分間、変性(94℃、30秒間); アニーリング(55℃、1分間); 伸長(72℃、2分間)を27サイクル、最後に72℃で5分間とした。

6-FAM、TETまたはHEXで標識した各PCR産物は、TAMURA標識されたサイズスタンダードと共に、1パネルのゲル(4% acrylamide/6M urea)上にて、DNAシーケンサー(ABI 377 : アプライドバイオシステム社製)内で電気泳動した。第4図はこの電気泳動の一例であるが、この方法では画像としてパターン認識されたサイズスタンダードを参照してDNA断片のピーク、大きさ、領域を解析するため、電気泳動による誤差を極力低くすることができる。その後、コンピューターに取り込まれた蛍光画像の位置からそれぞれのマ

一カー遺伝子のサイジングを行い、家系毎に親由来の遺伝子がどのように伝播したかを決定した。さらに、電気泳動の結果はジーンスキンの解析を経て、ジェノタイパー解析ソフトでサイジングされた。第5図はこのジェノタイパーによる解析結果の一例である。

### (3) 連鎖解析

マイクロサテライトマーカーによる連鎖解析を用いた同胞対解析法は、I型糖尿病の原因遺伝子の同定において既に公知であるが(Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 8560-8565, 1995)、慢性関節リウマチを対象とする場合にはこの方法をそのまま使用することはできない。何故ならば、通常の同胞対解析法は患者とその両親との間で同祖遺伝子(IBM: identical by descent)の遺伝様式を決定するが、老年性疾患である慢性関節リウマチの場合、患者はその発症時に既に両親が死亡していることがほとんどであり、IBM値を一義的に決定することが不可能だからである。

そこで、この発明ではIBM値を求めるに当たって、患者(A)、患者(B)、健常同胞(C)の3名の組み合わせを1組とし、35組について解析を行った。すなわち、IBM値とは本来親が保有する遺伝子aが両罹患同胞に分与された場合に1となり、罹患同胞がそれぞれの対立遺伝子を共有し、しかもその各々が親の片方から分与された場合には $IBM = 2$ となる。両親が既に死亡して親の遺伝子がタイピングできない時は、IBMは一義的に決定することはできない。ところが、解析の対象とする人種集団における任意の遺伝子マーカーの分布が決まっていれば、この遺伝子のアロタイプ頻度を用いてIBM値を決定することができる。つまり、患者(A)、患者(B)、健常同胞(C)の3名の間の見かけ上のIBMの一致を、

(A-B間のIBM値、A-C間のIBM値、B-C間のIBM値)

とし、任意の遺伝子に着目してこれをaとし、その他を  $\hat{a}$  としたとき、あり得る可能性は表1に示したとおりの27通りとなる。



表 1

- Case 1: (aa, aa, aa), (aâ, aâ, aâ), (ââ, ââ, ââ)
- Case 2: (aa, aa, ââ), (ââ, ââ, aa)
- Case 3: (aa, ââ, aa), (ââ, aa, aa), (aa, ââ, ââ), (ââ, aa, ââ)
- Case 4: (aa, aa, aâ), (ââ, aâ, aa), (aâ, aâ, ââ), (ââ, ââ, aâ)
- Case 5: (aa, aâ, aa), (aâ, aa, aa), (aa, aâ, aâ), (aâ, aa, aâ), (aâ, aâ, aâ), (ââ, aâ, aâ), (ââ, aâ, aâ)
- Case 6: (aa, ââ, aâ), (ââ, aa, aâ)
- Case 7: (aa, aâ, ââ), (aâ, aa, ââ), (aâ, ââ, aa), (ââ, aâ, aa)

このとき、遺伝子 a のアロタイプ頻度を  $P_a$  として、Holmans & Clayton (Am. J. Hum. Genet. 57: 1221-1232, 1995) の式 1 によって Lod 値 (L 値) が求められる。

$$\text{式 1: } L = \sum_{P \in P} \Pr \left( \begin{array}{c} \text{parental} \\ \text{genotypes } P \end{array} \right) \left[ \prod_{j=1}^{N_H} \Pr(g_i | P) \right] \times \sum_{j=0}^2 \Pr \left( \begin{array}{c} \text{genotypes of} \\ \text{affected pair} \end{array} \middle| \begin{array}{c} j \text{ IBD} \\ P \end{array} \right) z_j$$

例えば、表 1 の Case 1 の 3 通りの L 値をそれぞれ  $L_{11}$ 、 $L_{12}$ 、 $L_{13}$  として算出すると、これらの値は、各々、式 2、式 3 および式 4 で求められる。

$$\text{式 2: } L_{11} = P_a^4 z_0 + 1/2 P_a^3 (1+P_a) z_1 + 1/4 P_a^2 (1+P_a)^2 z_2$$

$$\text{式 3: } L_{12} = P_a^4 z_0 + 1/2 P_a^3 (1+P_a) z_1 + 1/4 P_a^2 (1+P_a)^2 z_2$$

$$\text{式 4: } L_{13} = 3P_a^2 P_a^2 z_0 + 1/2 P_a P_a (1+2P_a P_a) z_1 + P_a P_a (1+1/2 P_a P_a) z_2$$

同様にして、 $L_{11}$  から  $L_{72}$  までの L 値が算出される。さらに全被験者について同様の計算することによって、母集団における遺伝子 a の L 値が式 5 によって求められる。

$$\text{式 5: } L = \frac{n!}{n_0! n_1! \dots n_n!} L_n^{n_0} L_n^{n_1} \dots L_n^{n_n}$$

次いで、このL値は、変数  $Z_0, Z_1, Z_2$  を  $Z_0 \leq 1/2, Z_0 \leq 1/2 Z_1, Z_0 + Z_1 + Z_2 = 1$  の条件下で全ての範囲を変動させて最大L値 ( $L_{\max}$ ) を求める。一方、マーカーと実際の遺伝子の関連がなかった場合のL値 ( $L_{\text{null}}$ ) は、 $Z_0 = 0.25, Z_1 = 0.50, Z_2 = 0.25$  で固定し、次の式6で得られる。

$$\text{式6: } L_{\text{null}} = \frac{n!}{n_0! n_1! \dots n_n!} L_0^{n_0} L_1^{n_1} \dots L_n^{n_n}$$

最終的に、最大Lod値 (Maximal Load Score: MLS) が式7として求められる。

$$\text{式7: } \text{MLS} = \log \frac{L_{\max}}{L_{\text{null}}}$$

第6図から第9図は、解析した全359個のマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体毎にプロットした結果である。ここで、一つには、MLS値が3.0前後を示したマーカー部位を原因遺伝子とも対応関係が有意であると見なすことができる。すなわち、MLS値は、マーカーと原因遺伝子の対応関係が偶然に起こりうる場合と比較した確率であり、対数値  $\log_{10}$  で表されているから、 $\text{MLS} = 3.0$  の場合には、偶然に対応関係が生じるよりも1000倍高い確率で対応関係が存在すると見なすことができる。すなわち、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556およびDXS1232はMLS値が3.0前後と極めて高く、原因遺伝子の極めて近い位置を指示することが分かる。

また、第10図は、上記4つのマーカー部位を含めた複数のマーカー部位について、第1染色体(上段)、第8染色体(中段)およびX染色体(下段)ごとに、各マイクロサテライトマーカーのMLS値と疾患遺伝子との遺伝的距離(単位: センチモルガン)の関係を示したグラフ図である。この第10図に示したように、ヒト第1染色体については、マイクロサテライトマーカーD1S214および/ま

たはD1S253のマーク部位の極めて近い位置にターゲットとなる慢性関節リウマチの疾患遺伝子が存在することが分かる。同様に、ヒト第8染色体においては、マイクロサテライトマーカーD8S556のマーク部位、X染色体においては、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232のマーク部位の極めて近い位置に疾患遺伝子が存在することが分かる。

この発明の慢性関節リウマチ疾患遺伝子は、以上のとおりの特定の染色体座位に存在する遺伝子(上記したマイクロサテライトマーカーの8マーク部位 $\pm$ 1センチモルガン以内の少なくとも1カ所以上存在する遺伝子)であり、例えば、ポジショナルクローニング等の公知の方法によってそのコード領域を特定し、さらには塩基配列を決定することによって、有効な治療法の確立に大きく貢献することができる。また、この発明によって用いられたマイクロサテライト遺伝子のPCR増幅とその解析は、慢性関節リウマチの診断および原因因子の決定にも応用することができる。すなわち、罹患の可能性のある被験者のゲノムDNAを、上記の染色体座位に対応するマーカーをプライマーとしてPCR増幅し、第5図に示したようなジェノタイパーによる解析により健常者のそれと対比することによって、以後の発症を高い精度で判定することができる。

#### 産業上の利用可能性

この発明によって、ヒト慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、これらの疾患遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法が提供される。これらの発明は、医薬品開発および医療技術の開発等に利用可能である。

### 請求の範囲

1. ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および／またはD1S253がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

2. ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

3. ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

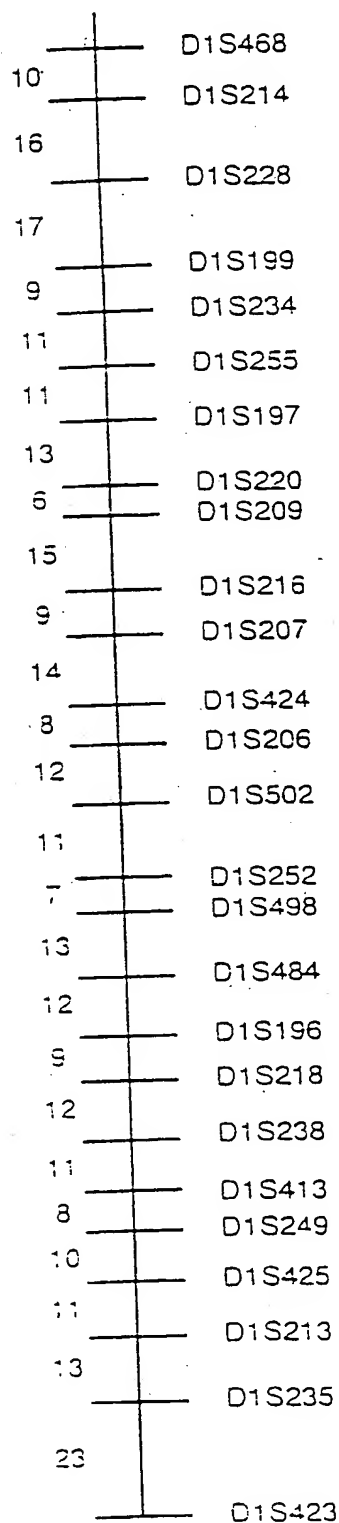
4. マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。

5. マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの原因因子の決定方法。

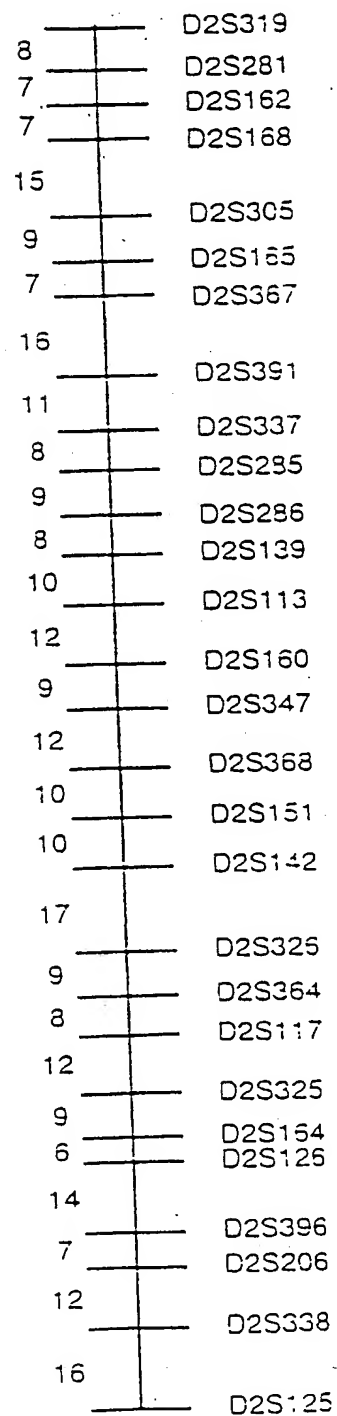
1/10

第1図

## Chromosome 1



## Chromosome 2

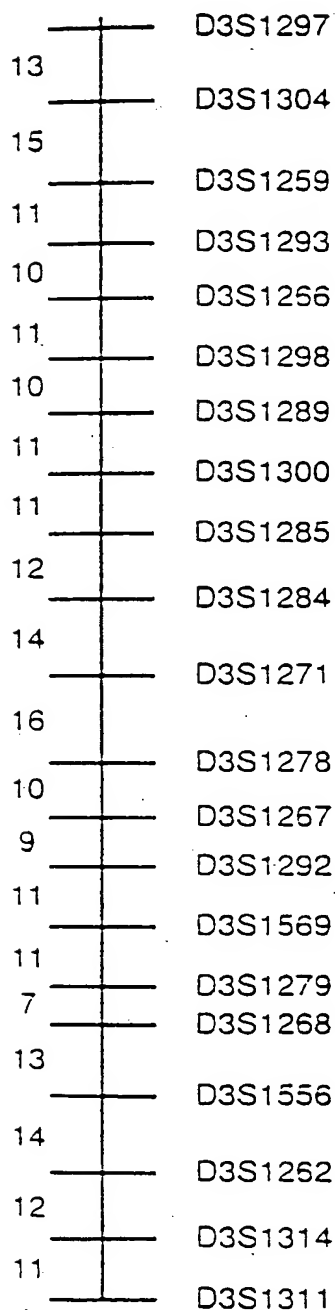


差替え用紙 (規則26)

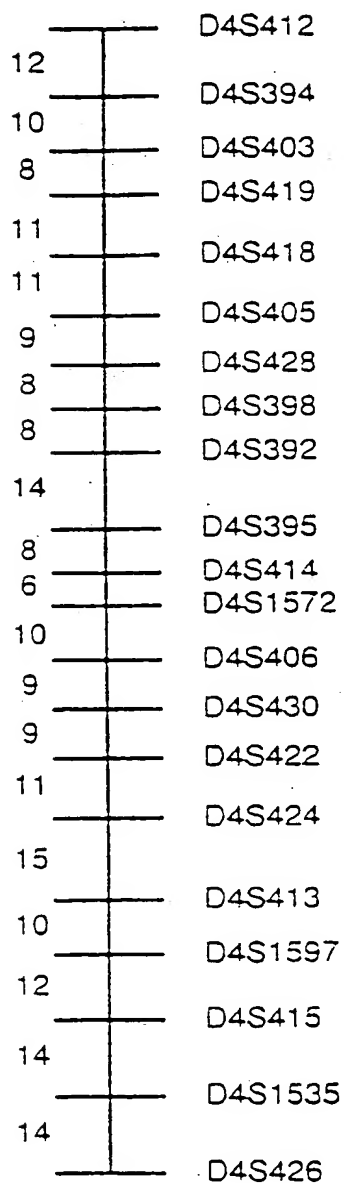
1 / 1 / 10

第1図の続き

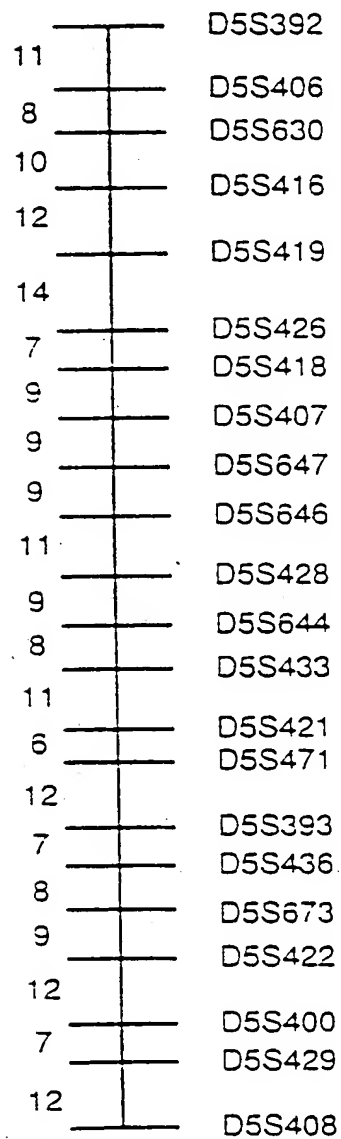
## Chromosome 3



## Chromosome 4

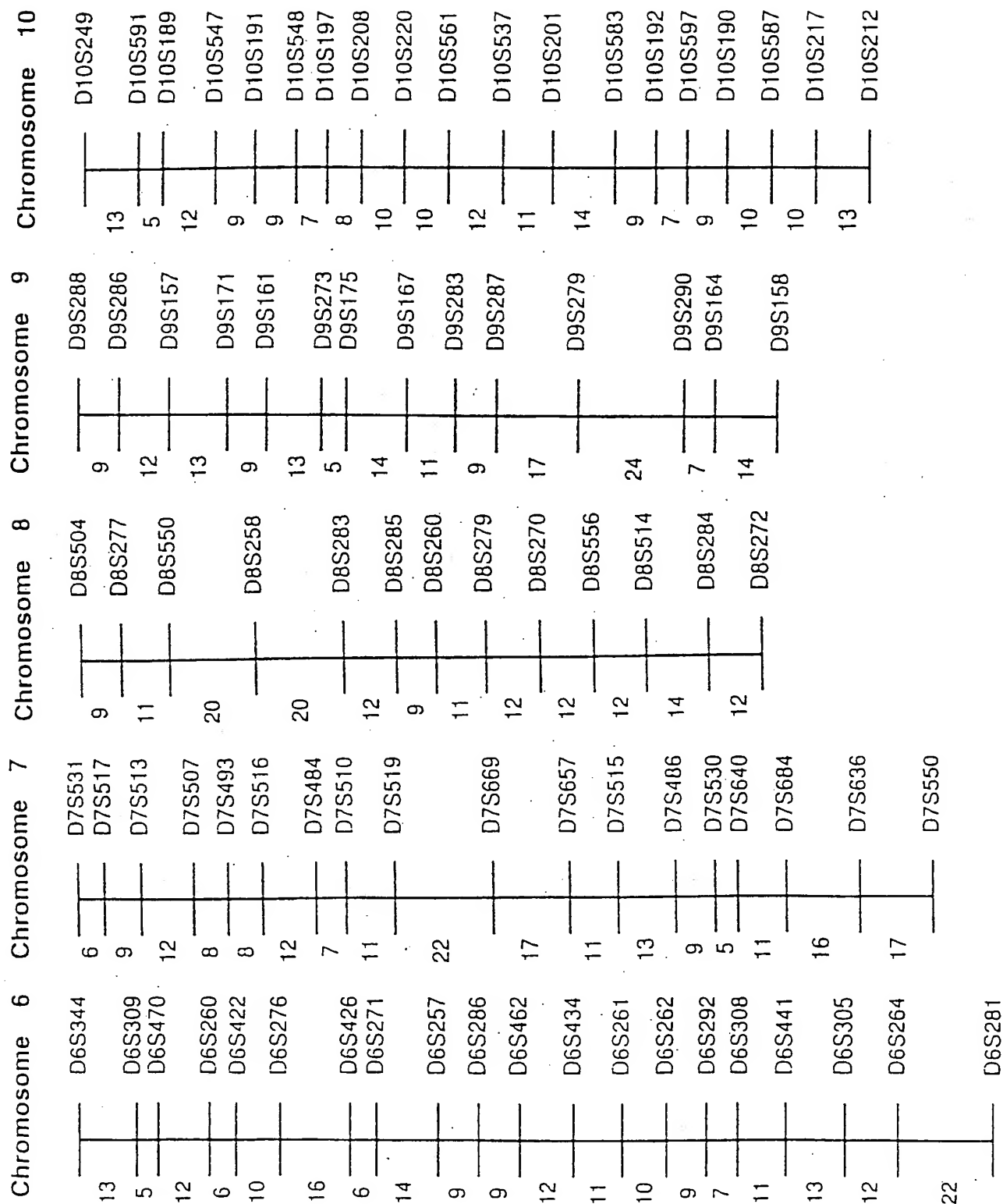


## Chromosome 5

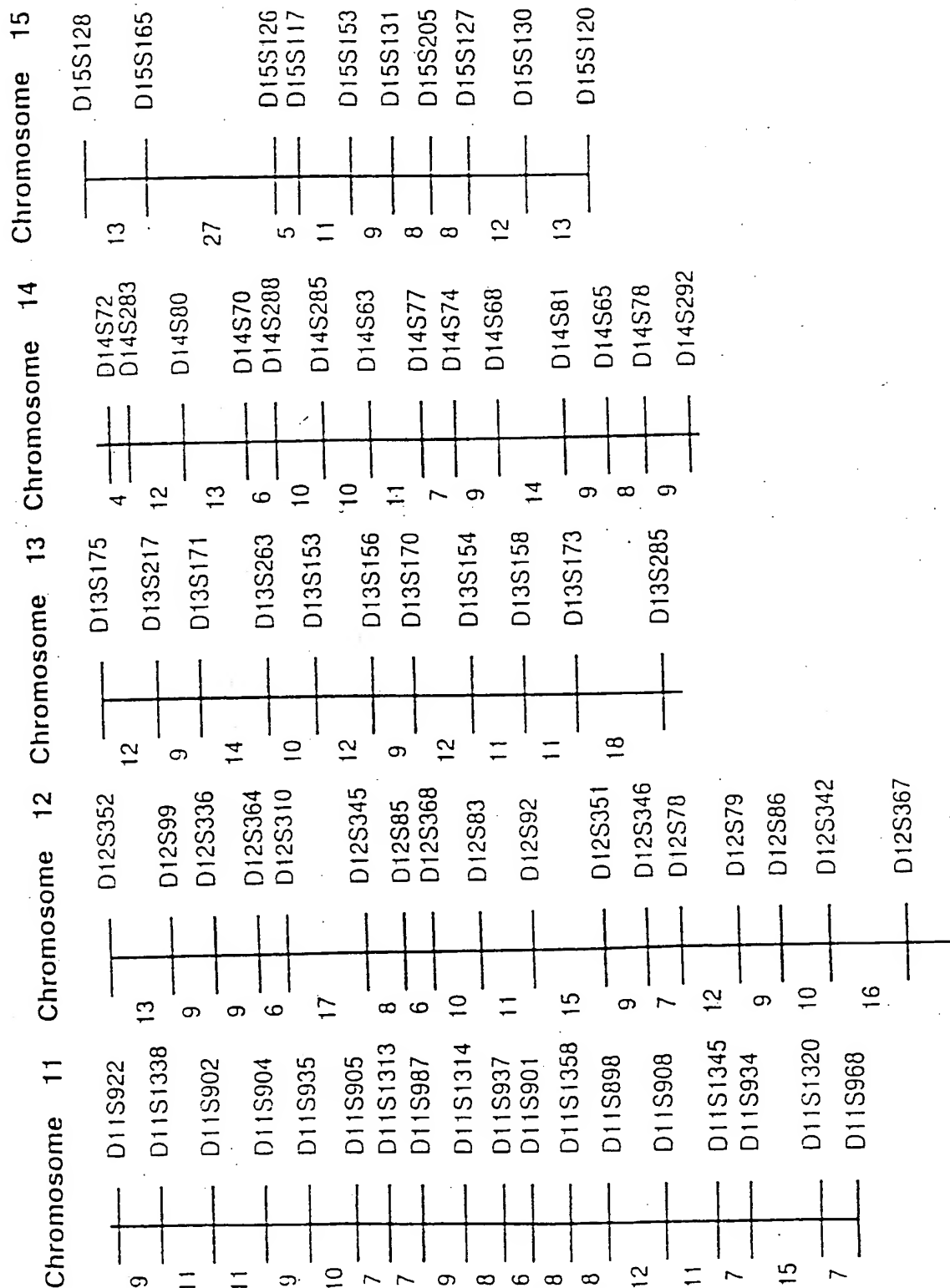


2/10

第2図



2 / 1 / 10  
第2図の続き

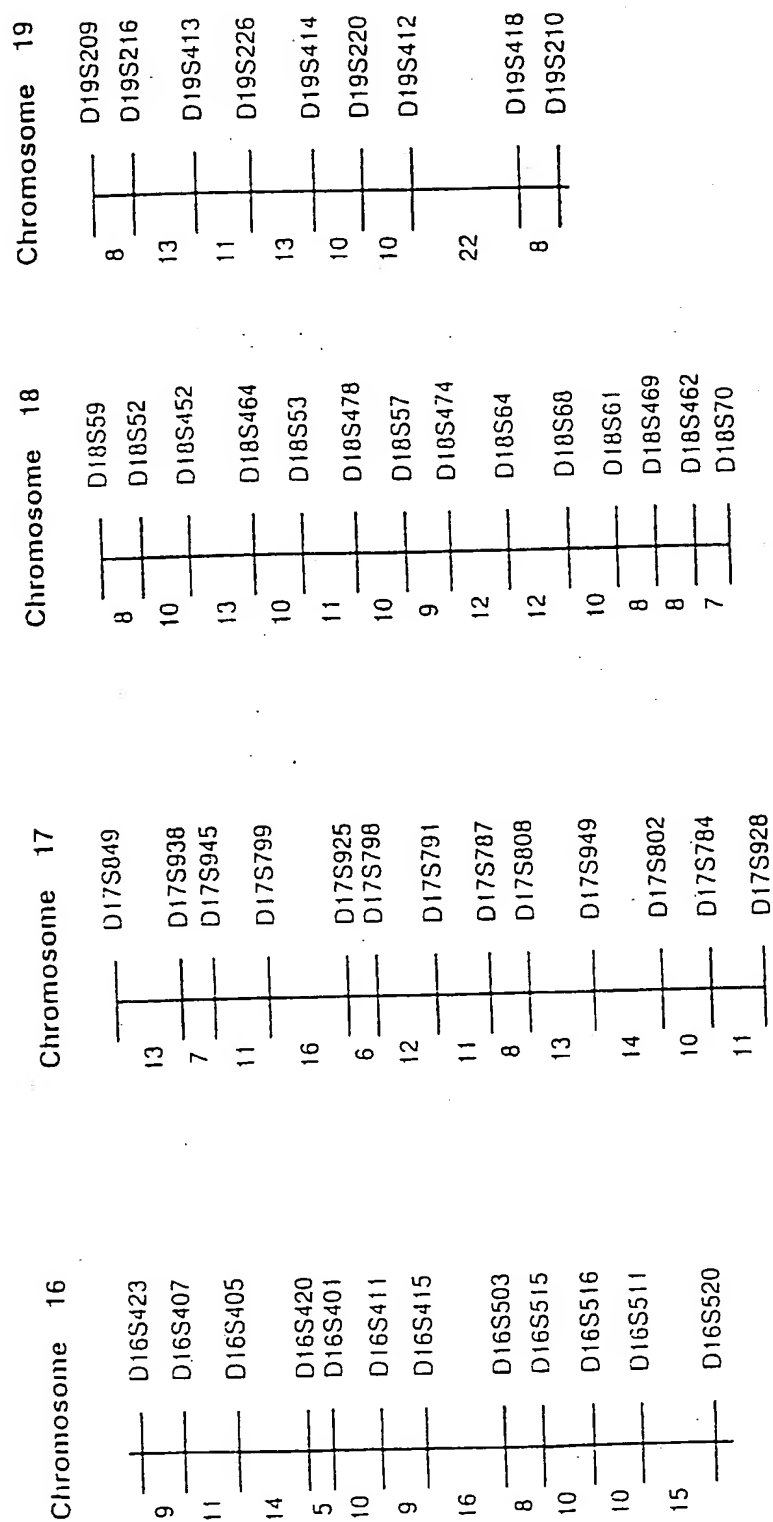


差替え用紙 (規則26)



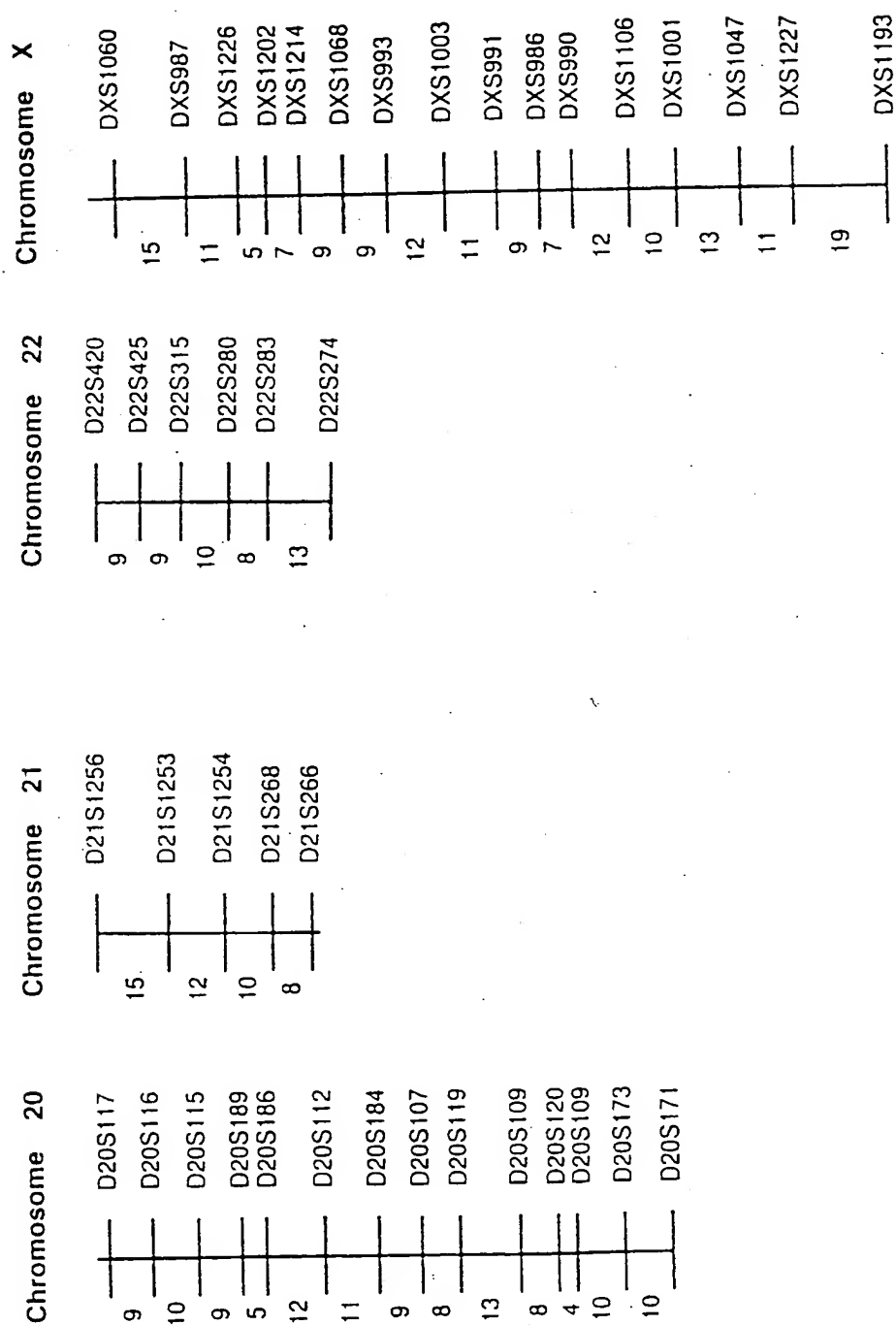
3/10

## 第3図

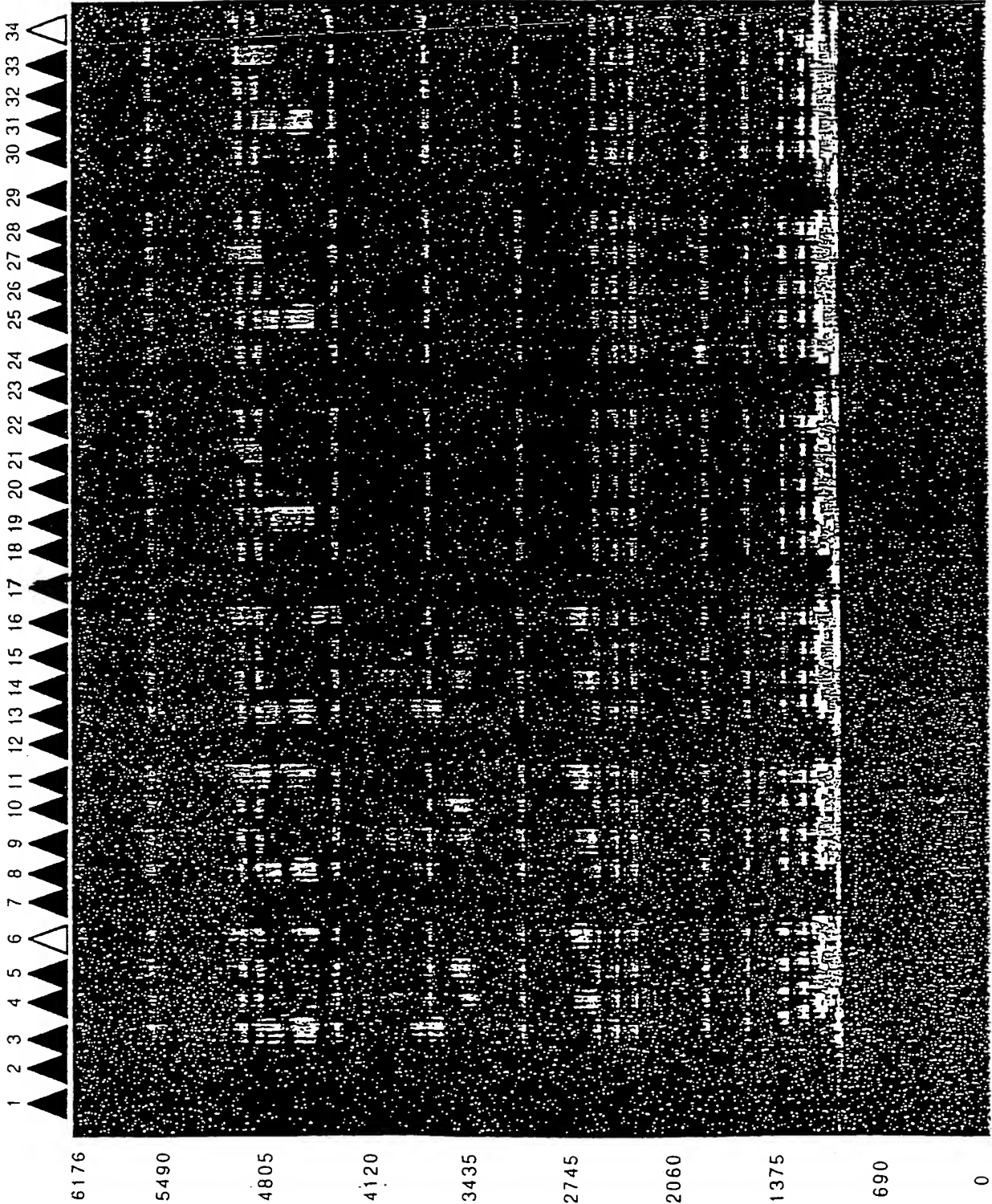


差替え用紙 (規則26)

3 / 1 / 10  
第3図の続き

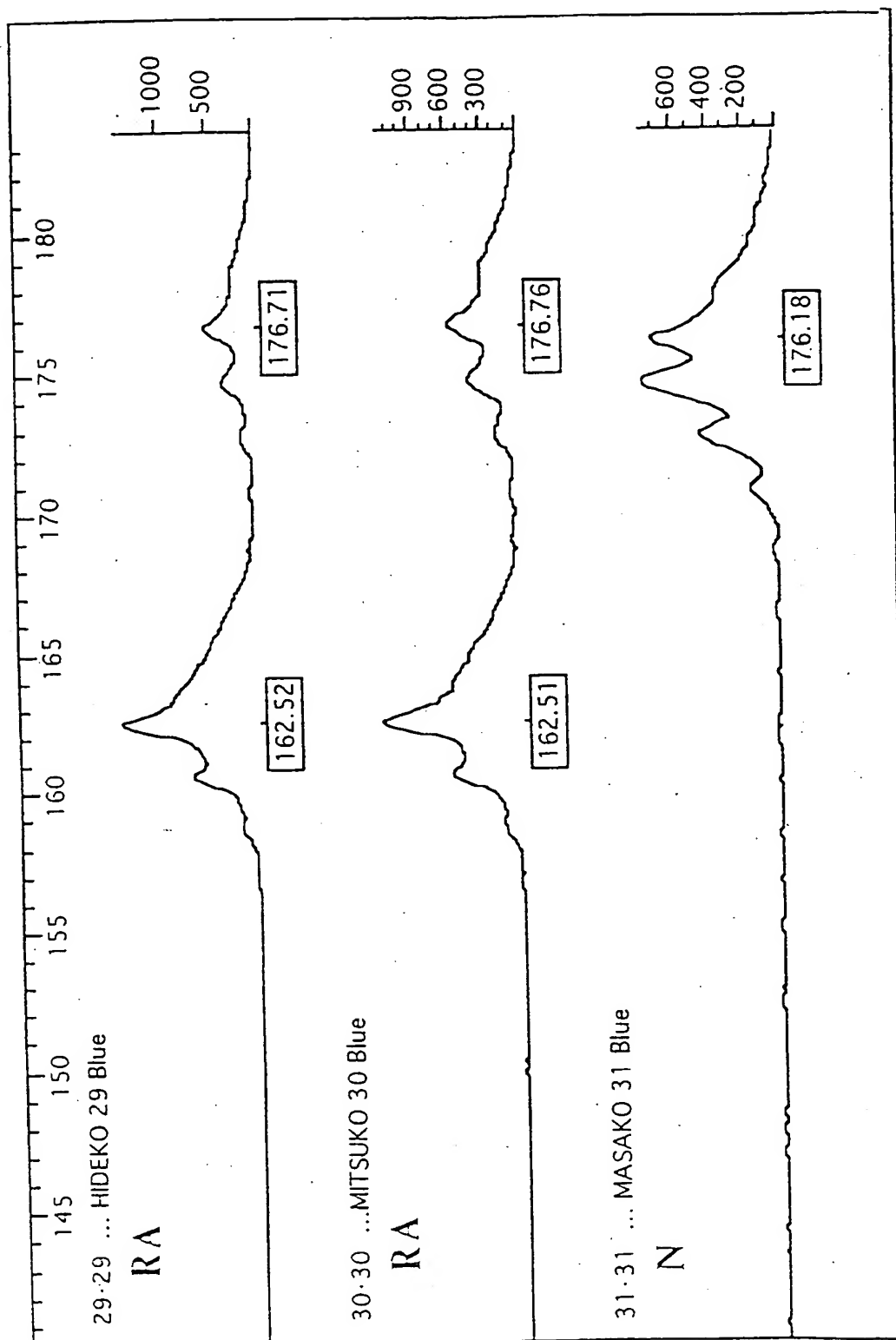


4/10  
第4図



5/10

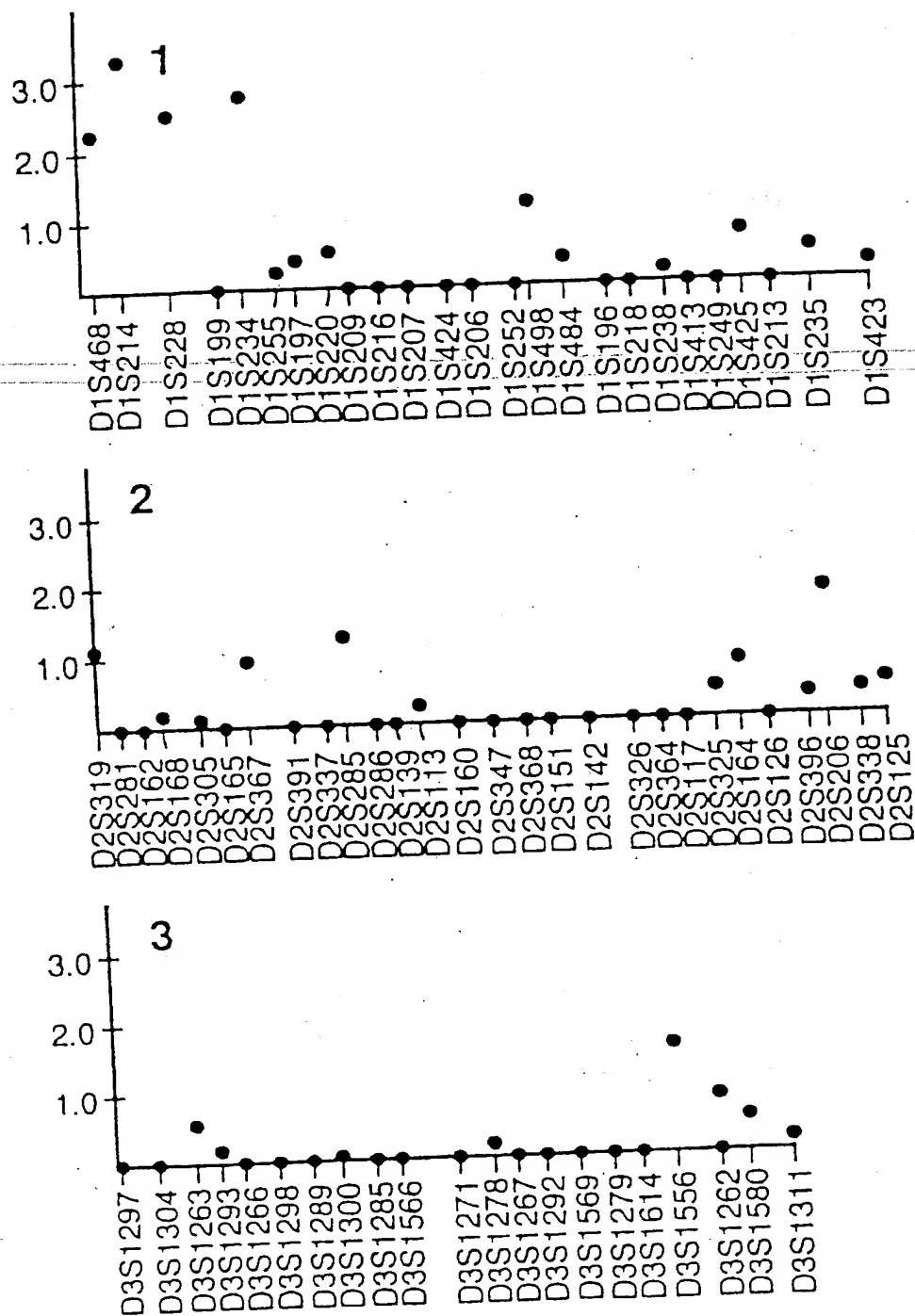
第5図



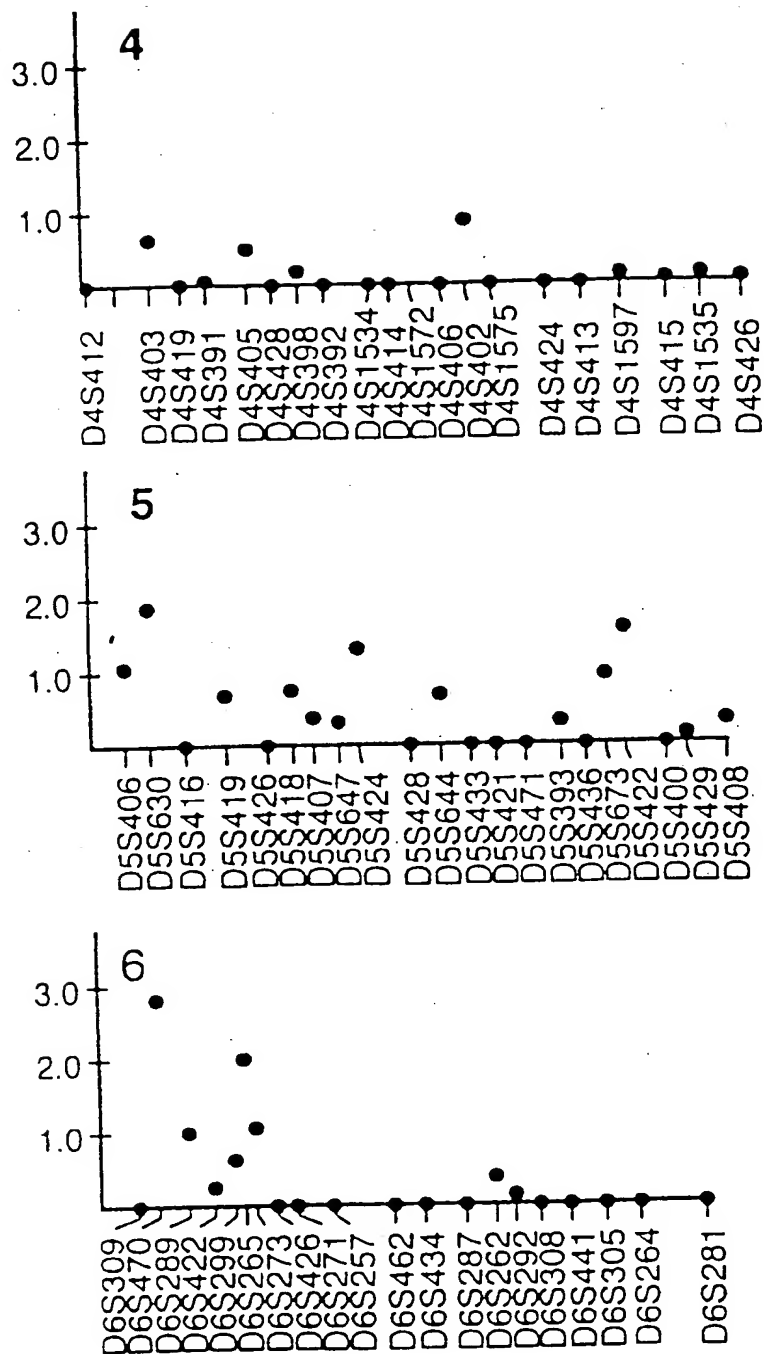
差替え用紙 (規則26)

6 / 10

第6図

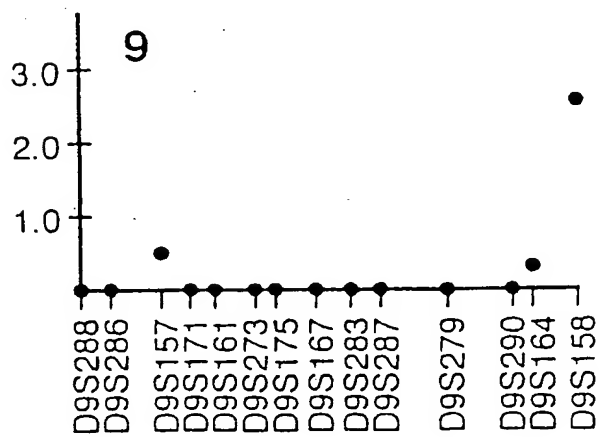
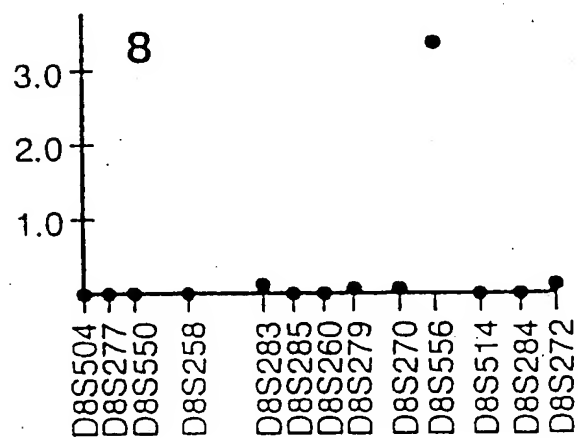
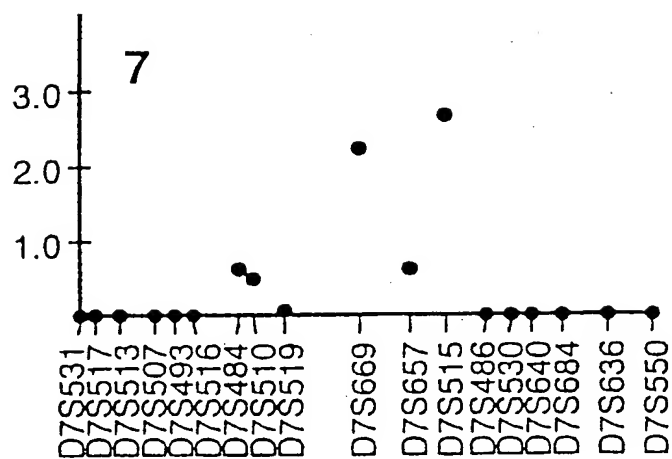


6 / 1 / 10  
第6図の続き

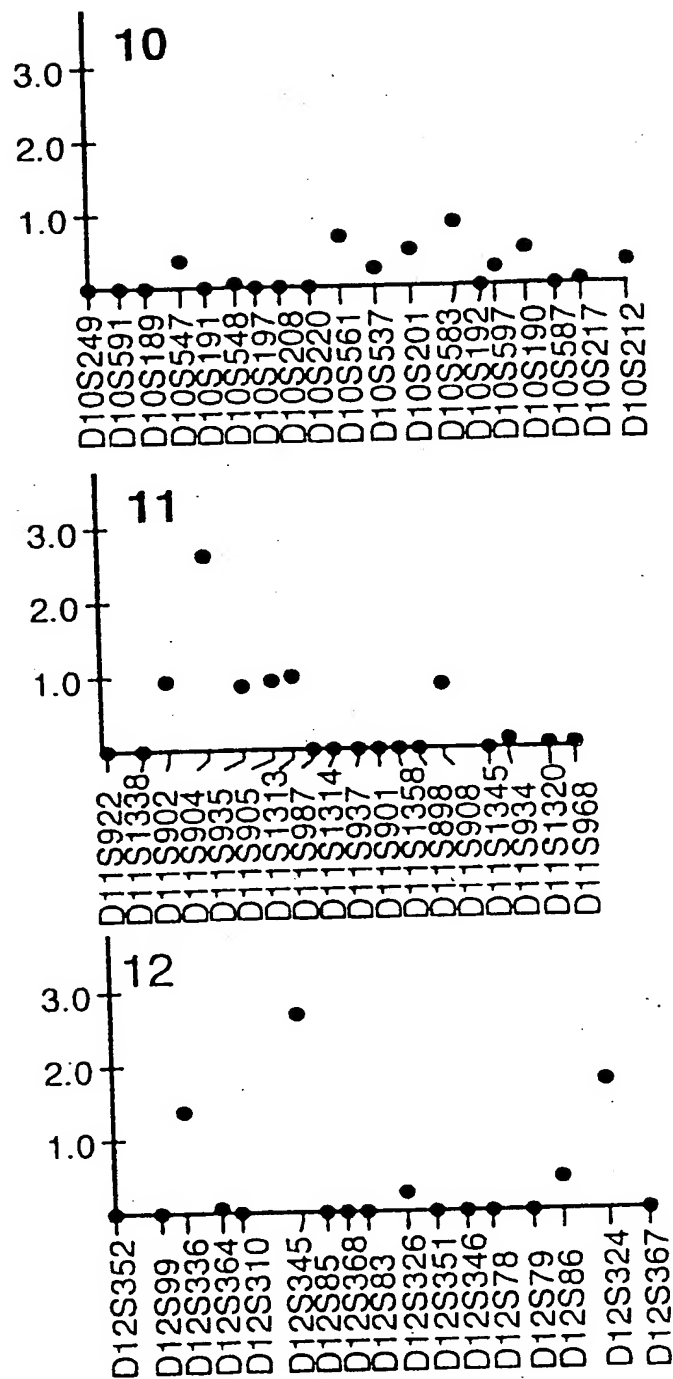


7/10

第7図



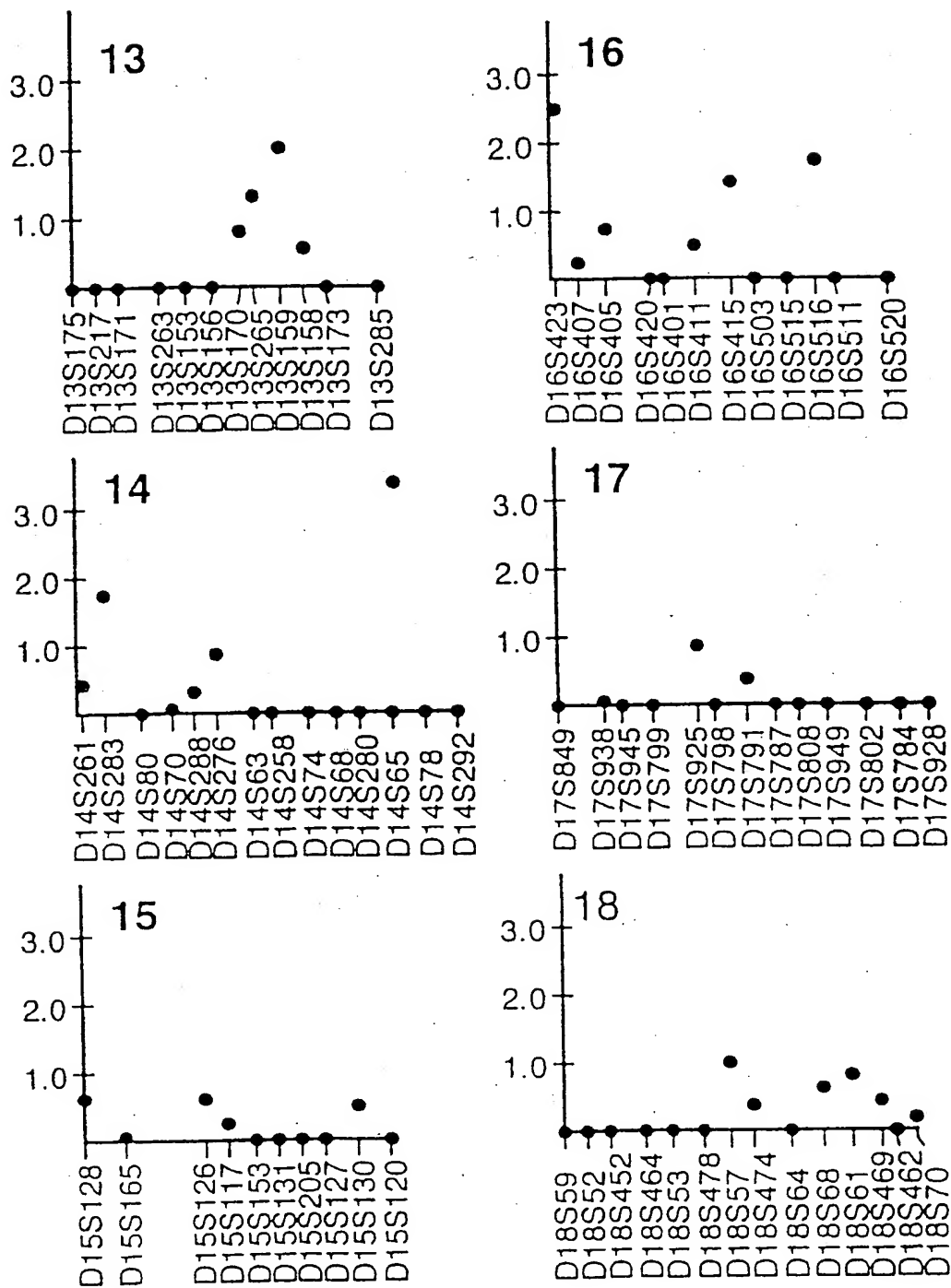
7 / 1 / 10  
第7図の続き



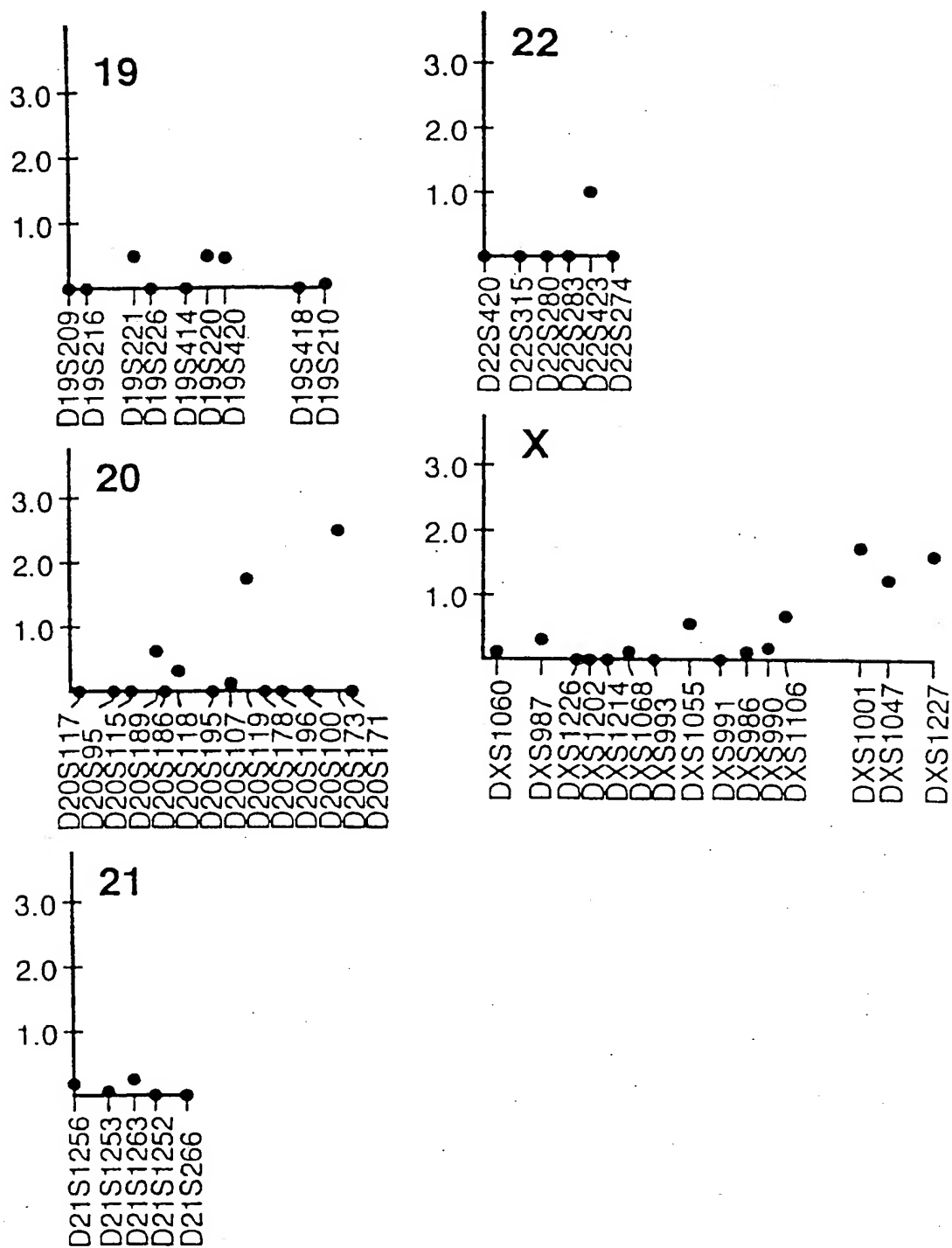


8/10

第8図



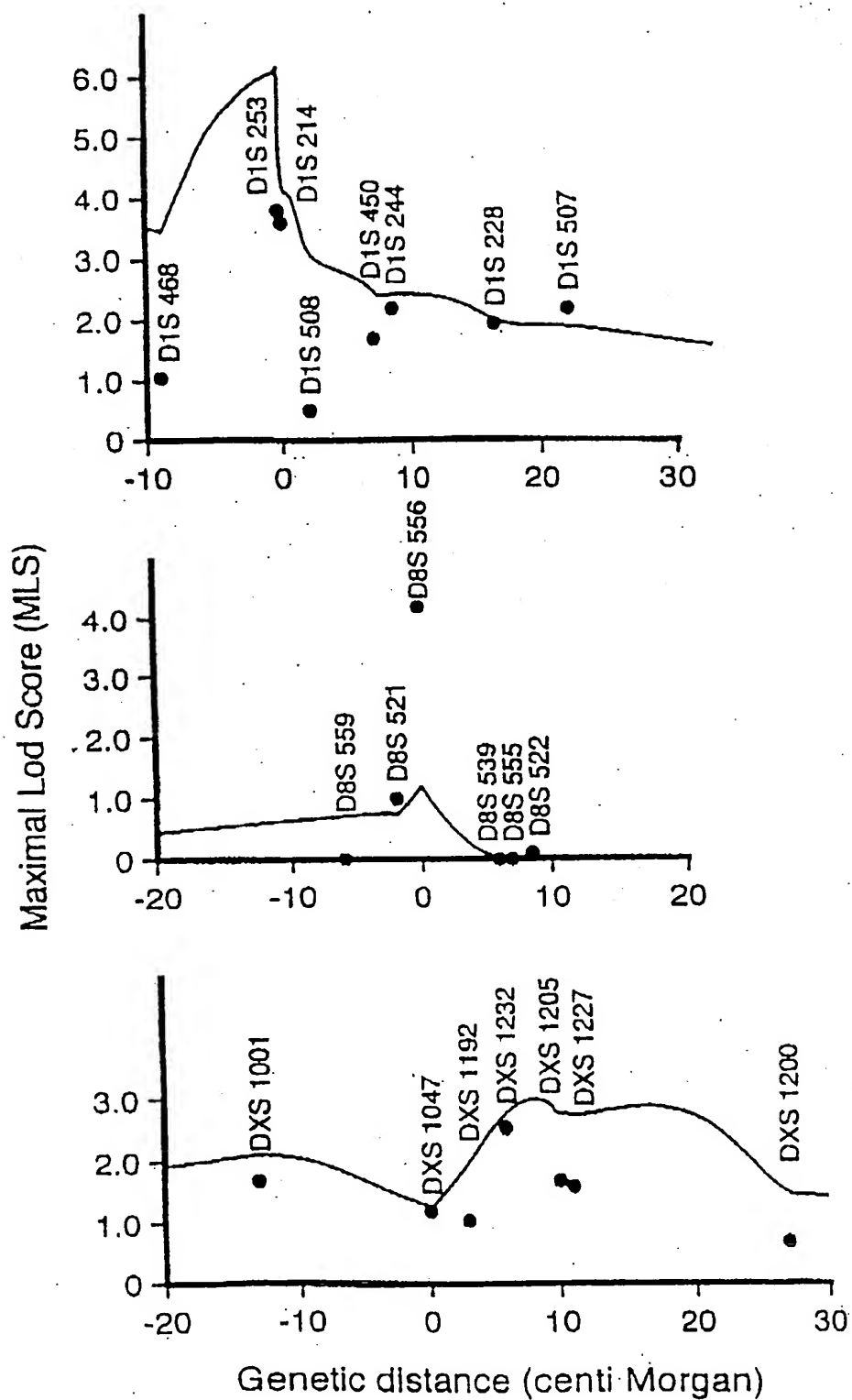
9/10  
第9図



差替之用紙 (規則26)

10/10

第10図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/01665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nature Genetics Vol. 14 No. 1 (1996) Wilder R L et al., "A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats" p.82-85	1-3, 5
A	Cell Vol. 85 (1996) Timothy J. Vyse et al., "Genetic Analysis of Autoimmune Disease" p.311-318	1-3, 5
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92 (1995) John A. Todd "Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches" p.8560-8565	1-3, 5
A	Am. J. Hum. Genet. Vol. 57 (1995) Peter Holmans et al., "Efficiency of Typing Unaffected Relatives in an Affected-Sib-Pair Linkage Study with Single-Locus and Multiple Tightly Linked Markers" p.1221-1232	1-3, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
August 7, 1998 (07. 08. 98)

Date of mailing of the international search report  
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01665

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NATURE Vol. 359 (1992) Jean Weissenbach et al., "A second-generation linkage map of the human genome" p.794-801	1-3, 5
A	Akio Nishimura, "The Japanese Journal of Clinical Medicine", Vol. 50, No. 3 (1992), Nihon Rinshosha, pages 11 to 15	1-3, 5

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nature Genetics Vol.14 No.1 (1996) Wilder R L et al. 「A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats」 p.82-85	1-3, 5
A	Cell Vol.85 (1996) Timothy J. Vyse et al. 「Genetic Analysis of Autoimmune Disease」 p.311-318	1-3, 5
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92 (1995) John A. Todd 「Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches」 p.8560-8565	1-3, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Am. J. Hum. Genet. Vol. 57 (1995) Peter Holmans et al. 「Efficiency of Typing Unaffected Relatives in an Affected- Sib-Pair Linkage Study with Single-Locus and Multiple Tightly Linked Markers」 p. 1221-1232	1-3, 5
A	NATURE Vol. 359 (1992) Jean Weissenbach et al. 「A second-generation linkage map of the human genome」 p. 794-801	1-3, 5
A	西村昭緒 「日本臨牀」 第50巻 第3号 (1992) 日本臨牀社 第11-15頁	1-3, 5